

IMMUNOSTIMULATING COMPOSITION CONTAINING MANNOSE OLIGOSACCHARIDE

Publication number: JP2004051582 (A)

Also published as:

Publication date: 2004-02-19

 JP4307800 (B2)

Inventor(s): ASANO ICHIRO; FUJII SHIGEYOSHI

Applicant(s): AJINOMOTO GENERAL FOODS INC

Classification:

- International: A23K1/14; A23K1/16; A23L1/30; A23L2/38; A23L2/52; A61K31/7004; A61K31/7016; A61K31/702; A61K31/736; A61K36/00; A61P37/04; C07H3/02; C07H3/04; C07H3/06; C08B37/00; A23K1/14; A23K1/16; A23L1/30; A23L2/38; A23L2/52; A61K31/7004; A61K31/7016; A61K31/702; A61K31/736; A61K36/00; A61P37/00; C07H3/00; C08B37/00; (IPC-1-7): C07H3/02; C07H3/04; C07H3/06; A61K31/7004; A23K1/14; A23K1/16; A23L1/30; A23L2/38; A23L2/52; A61K31/7016; A61K31/702; A61K31/736; A61K35/78; A61P37/04; C08B37/00

- European:

Application number: JP20020213324 20020723

Priority number(s): JP20020213324 20020723

Abstract of JP 2004051582 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a composition having immunostimulating action and containing an oligosaccharide comprising a saccharide composed mainly of mannose as a main component and a food or a beverage and feed using the composition.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-51582

(P2004-51582A)

(43) 公開日 平成16年2月19日(2004.2.19)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A61K 31/7004	A61K 31/7004	2B150
A23K 1/14	A23K 1/14	4B017
A23K 1/16	A23K 1/16 303D	4B018
A23L 1/30	A23L 1/30 Z	4C057
A23L 2/38	A23L 2/38 Z	4C086
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-213324 (P2002-213324)
 (22) 出願日 平成14年7月23日(2002.7.23)

(71) 出願人 000243766
 味の素ゼネラルフーズ株式会社
 東京都品川区東品川2丁目2番8号
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠武
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行
 (74) 代理人 100077506
 弁理士 戸水 辰男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マンノオリゴ糖を含有する免疫賦活組成物

(57) 【要約】

【課題】 マンノースを主体とする構成糖からなるオリゴ糖類を主成分とする免疫賦活作用を有する組成物、及びその組成物を用いた飲食物及び飼料の提供。

【解決手段】 繊維成分に対し、マンノースを主体とする単糖類が1乃至10分子結合したオリゴ糖類又はマンノースとグルコース及びガラクトースのような単糖類の少なくとも1種とが1乃至10分子結合したマンノースを主体としたオリゴ糖類の含有割合が60重量%以上である免疫賦活作用を有する組成物又はその組成物を含有する飲食物又は飼料。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

マンノースを主体とした単糖が1乃至10分子結合したオリゴ糖類又はマンノースとグルコース及びガラクトースのような単糖類の少なくとも1種とが1乃至10分子結合したマンノースを主体としたオリゴ糖を主成分とすることを特徴とする免疫賦活作用を有する組成物。

【請求項2】

総固形分に対し、マンノースを主体とする単糖類が1乃至10分子結合したオリゴ糖類又はマンノースとグルコース及びガラクトースのような単糖類の少なくとも1種とが1乃至10分子結合したマンノースを主体としたオリゴ糖類の含有割合が60重量%以上である請求項1に記載の組成物。

10

【請求項3】

糖組成において、マンノース残基の割合が70重量%以上である請求項1乃至2のいずれかに記載の組成物。

【請求項4】

マンノースを主体としたオリゴ糖類が、マンノースが2乃至6分子結合したオリゴ糖類の中から選ばれた1種以上であることを特徴とする請求項1乃至2のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】

請求項1乃至4のいずれかに記載の組成物がマンナンを加水分解処理することによって得られる組成物。

20

【請求項6】

前項のマンナンがコーヒー豆及び／またはコーヒー抽出残から得られるものである請求項1乃至5のいずれかに記載の組成物。

【請求項7】

請求項1乃至6のいずれかに記載の組成物を含有する飲食物または飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、マンノースを主体とする構成糖からなるオリゴ糖類を主成分とする免疫賦活作用を有する組成物、及びその組成物を用いた飲食物及び飼料に関するものである。

30

【0002】

【従来の技術】

免疫は、外界から侵入してきた微生物、ウィルス、有害化学物質のみならず、身体の中で作られた癌細胞などの多くのものから身体を守り、健康な状態を維持するための生体防御機構の一つである。免疫機能を活性化させて健康な身体を維持することは、予防医学の観点から重要である。特に高齢化社会に向かい生活習慣病や癌などが問題になっており、これらの疾病を未然に防止するため「食と健康」に関心が寄せられている。そのため種々の食品中から免疫賦活物質の探索やその作用機作についての研究が行われている。そして各種の健康補助食品が開発・販売されているが、日常の食生活で手軽にそして経済的に免疫を活性化できる飲食品の開発には至っていない。

40

【0003】

また、本発明は未利用資源の有効活用にも関するものである。コーヒーの抽出残は、従来、そのほとんどが焼却あるいは産業廃棄物として処理されてきた。近年になり、コーヒー抽出残が堆肥原料あるいは活性炭原料として利用されるようになってきたが、それらは未利用資源の高度利用という観点からは十分とはいえず、更なるコーヒー抽出残の高度利用の方法を確立することは重要課題となっている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、免疫賦活作用を有する組成物を開発すること、および、通常の食生活習慣の大

50

幅な変更を伴うことなく、しかも免疫賦活効果に優れた経済的かつ簡便な飲食物を提供することを目的としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、これらのような課題を解決するために鋭意検討の結果、マンナンを多く含む食品素材、主に、コーヒー抽出粕加水分解物から、糖鎖中にマンノース残基以外の糖残基の含有量が少ない重合度1乃至10のマンノオリゴ糖類又はマンノースとグルコース及びガラクトースのような単糖類の少なくとも1種とが1乃至10分子結合したマンノースを主体としたオリゴ糖類に免疫賦活効果を見だし、本発明を完成するに至った。さらに、無着色、無酸の糖鎖中にマンノース残基以外の糖残基の含有量が少ない重合度1乃至10のマンノオリゴ糖類を得ることで、食品への適用範囲を飛躍的に広げることができることを見いだした。

10

本発明は、マンノースを主体とした単糖が1乃至10分子結合したオリゴ糖類又はマンノースとグルコース及びガラクトースのような単糖類の少なくとも1種とが1乃至10分子結合したマンノースを主体としたオリゴ糖を主成分とすることを特徴とする免疫賦活作用を有する組成物に関する。当該組成物は、マンノースもしくはマンノースを主体とした単糖が2乃至10分子結合した単一の化合物、または、それらの中から選ばれた2種以上のオリゴ糖を主成分とする組成物を意味する。

本発明の組成物において、マンノースが1乃至10分子結合した単一の化合物ないしはそれらの中から選ばれた2種以上の化合物を含有する免疫賦活作用を有する組成物であることが望ましい。

20

【0006】

本発明の組成物において、総固形分に対し、マンノースを主体とする単糖類が1乃至10分子結合したオリゴ糖類又はマンノースとグルコース及びガラクトースのような単糖類の少なくとも1種とが1乃至10分子結合したマンノースを主体としたオリゴ糖類の合計含有割合が60重量%以上のものが好ましく、80重量%以上のものがさらに好ましい。

【0007】

本発明における組成物の糖組成においてはマンノース残基の割合が70重量%以上、更に好ましくは80重量%以上であるものが望ましい。マンノース残基の割合が70%に満たないと、効果が大きく期待できなるとともに、甘味度も増し適用の幅が狭まる傾向にある。構成糖としては、マンノース以外には、加水分解する出発物質にもよるがグルコース、ガラクトースなどが含まれるが必要に応じて除去することもできる。組成物中の遊離のマンノース含量については50%以下に抑えられたものが望ましい。50重量%を超えると、マンノース由来の苦味のために、適用の範囲に制約を受ける傾向にある。さらに、マンノースを主体としたオリゴ糖類は、マンノースが2乃至6分子結合したオリゴ糖類であることが好ましい。

30

本発明においては、マンナンを加水分解処理することによって得られたマンノースを主成分とする免疫賦活作用を有する組成物が好ましい。また、当該マンナンがコーヒー豆及び／またはコーヒー抽出残から得られるものであることが好ましい。

さらに、本発明においては、コーヒー抽出残を加水分解処理することによって得られたマンノースを主成分とする免疫賦活作用を有する組成物が好ましい。

40

また、本発明は、上記に説明した本発明に係る組成物を含有する飲食物及び飼料にも関する。なお、本発明に係る組成物は、飲食物、飼料のみならず化粧品、医薬品等幅広い分野で使用することが可能である。本発明の組成物は、飲食物として人が口から摂取することにより免疫賦活効果を発揮する。

本発明の組成物は、例えばココナツ椰子から得られるコアラミール、フーク、南アフリカ産椰子科植物Huacra Palm、ツクネイモマンナン、ヤマイモマンナンよりマンナンを抽出後、酸加水分解、高温加熱加水分解、酵素加水分解、微生物発酵の中から選ばれる1種または2種以上の方法で処理し、活性炭処理、吸着樹脂処理、イオン交換樹脂処理、イオン交換膜処理等の方法で精製された糖混合物及び／またはコンニャクイモ、ユリ

50

、スイセン、ヒガンバナ等に含まれるグルコマンナン、ローカストビーンガム、グアーガム等に含まれるガラクトマンナンを酸加水分解、高温加熱加水分解、酵素加水分解、微生物発酵の中から選ばれる１種または２種以上の方法で処理し、活性炭処理、吸着樹脂処理、イオン交換樹脂処理、イオン交換膜処理等の方法で分離精製し構成糖としてマンノースの比率を高めたものであってもよい。

さらに、コーヒー生豆または焙煎したコーヒー豆を酸加水分解、高温加熱加水分解、酵素加水分解、微生物発酵の中から選ばれる１種または２種以上の方法で処理し、活性炭処理、吸着樹脂処理、イオン交換樹脂処理、イオン交換膜処理等の方法で精製することによって得ることができる。

あるいは、コーヒー抽出残 を、酸加水分解、高温加熱加水分解、酵素加水分解、微生物発酵の中から選ばれる１種または２種以上の方法で可溶化処理した水溶液を活性炭処理、吸着樹脂処理、イオン交換樹脂処理、イオン交換膜処理等の方法で精製することによって得ることができる。

一般に、焙煎粉碎コーヒーを商業用の抽出器にて抽出すると、その際に焙煎コーヒーに含まれるガラクトマンナンの側鎖であるガラクトースが可溶化したり、アラビノガラクトタンが加水分解によって可溶化する。従って、コーヒー抽出残 中にはマンナンが豊富であり、しかも直鎖構造をとっているものと推定される。一方、セルロースは分解されにくく残 として残っているが、セルロースを分解せずにマンナンを特異的に加水分解する条件を適宜選択することにより、マンノースを主体とするオリゴ糖を得ることができる。

本発明において使用されるコーヒー抽出残 は通常の液体コーヒーあるいはインスタントコーヒー製造工程において抽出されたものであれば、常圧下、加圧下抽出であろうと、またいかなる起源、製法のものであっても使用することができる。

コーヒー抽出残 を酸及び／または熱により加水分解しオリゴ糖類を高純度を含むように調製した組成物を液体コーヒー、インスタントコーヒー等にそのまま添加して使用することもできるが、必要に応じて活性炭、イオン交換樹脂、溶剤等で脱色、脱臭、脱酸等の精製処理をしたものを添加した方がコーヒー本来の味、香りのより豊かなコーヒーを提供することができる。

【０００８】

更に、カラムクロマトグラフィー等で特定の重合度をもつマンノオリゴ糖に分画した上で使うこともできる。

以下に本発明において、コーヒー抽出残 からマンノースを主成分とする単糖類が１乃至１０分子結合したオリゴ糖類を含有する組成物を製造する代表的な方法を述べるが、必ずしも以下の製法に限定されるものではない。

コーヒー抽出残 を分解する方法としては、酸及び／または高温により加水分解する方法、酵素により分解する方法、微生物発酵により分解する方法が挙げられる。酸及び／または高温により加水分解する方法としては特開昭６１－９６９４７号、特開平２－２００１４７号等に開示されている。商業用のコーヒー多段式抽出系において出てくるコーヒー抽出残 を反応容器中において酸触媒を添加して加水分解することもできるし、酸触媒を添加せずに高温で短時間処理して加水分解することによっても得ることができる。管形栓流反応器を使用するのが便利であるが比較的高温で短時間の反応を行わせるのに向いているものならば、いかなる反応器を使用しても良好な結果が得られる。反応時間と反応温度を調節し、可溶化して加水分解させることによってＤＰ１０乃至４０のマンナンをＤＰ１乃至１０のマンノオリゴ糖に分解し、その後コーヒー残 と分離してマンノオリゴ糖類を得る。

「マンナン」という用語は、広く α -マンノースからなる多糖を意味する。単糖 α -マンノースはアルドヘキソースであり、 α -グルコース中のカルボキシル基に隣接する炭素に結合している水酸基の立体配置が逆になっているものである。「オリゴ糖」は、単糖の数が比較的少ないポリマーを意味する。とくに、本明細書においては、単糖の数が１０以下であるポリマーをさす。マンノースは、便宜上ＤＰ１のオリゴ糖とするが、厳密にいうとオリゴ糖は２以上の単糖からなるものをさす。

10

20

30

40

50

「重合度」または「DP」とは、オリゴ糖を構成している単糖の数を意味する。従って、たとえばマンノースが4つの単糖から構成されているマンノオリゴ糖の重合度は4であるのでDP4と記載する。

【0009】

「コーヒー抽出残渣」とは、たとえば大気条件下あるいは加圧条件下で焙煎粉碎コーヒーを水などの溶媒で抽出した後のいわゆるコーヒー抽出粕を意味する。また、酵素により分解する方法としては、例えばコーヒー抽出残渣を水性媒体に懸濁させ、こごへ例えば市販のセルラーゼ及びヘミセルラーゼ等を加えて攪しながら懸濁させればよい。酵素の量、作用させる温度及びその他の条件としては、通常の酵素反応に用いられる量、温度、条件であれば特に問題はなく、使用する酵素の最適作用量、温度、条件及びその他の要因によって適宜選択すればよい。

10

また、微生物発酵により分解する方法としては、例えば水性媒体に懸濁させたコーヒー抽出残渣にセルラーゼ、ヘミセルラーゼなどを産出する微生物を接種して培養させればよい。使用する微生物は、細菌類や担子菌類などコーヒー抽出残渣中のマンナンを分解する酵素を産出するものであれば良く、使用する微生物によって培養条件などは適宜選択すればよい。

【0010】

上記の方法によって得られたマンノースを主体とする単糖類が1乃至10分子結合したオリゴ糖類を含有する組成物を含む反応液は、必要に応じて精製を行う。精製法としては、骨炭、活性炭、炭酸飽和法、吸着樹脂、マグネシア法、溶剤抽出法等で脱色・脱臭を行い、イオン交換樹脂、イオン交換膜、電気透析等で脱塩、脱酸を行う。精製法の組み合わせ及び精製条件としては、マンノースが1乃至10分子結合したマンノオリゴ糖類を含む反応液中の色素、塩、及び酸等の量及びその他の要因に応じて適宜選択すればよい。

20

【0011】

【作用及び発明の効果】

このようにして得られたマンノースを主体とする単糖類が1乃至10分子結合したオリゴ糖類を含有する組成物（以下、「マンノオリゴ糖」あるいは、単に「MOS」という。）には、リンパ球を幼若化して分裂を誘起させる作用は有していないが、リンパ球の分裂を促進増強させる作用が認められた。

本発明にかかる組成物であるMOSは、Bリンパ球に働くLPSの刺激によって起こる分裂よりもTリンパ球に働くPHAの刺激によって起こる分裂を促進増強させる作用の方が大きかったことから、MOSは、Tリンパ球の活性化に強く作用するといえる。

30

【0012】

Bリンパ球は、抗原刺激により分裂・分化して抗体産生細胞となり、体液性免疫系に関与する。一方、Tリンパ球は、抗原刺激を受けて分裂・分化を感作リンパ球となり、細胞性免疫系に関与するだけでなく、ヘルパー細胞となってBリンパ球の分化増殖にも働き、体液性免疫系にも関与する。

MOSは、リンパ球が抗原刺激を受けた時、リンパ球分裂・増殖を促進する作用を有する、特に、体液性・細胞性免疫に関与するTリンパ球を活性化させることから免疫賦活作用を有していることを見出した。

40

次に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1

マンノオリゴ糖の調製

コーヒー抽出残渣を反応器に送りやすくするために、まず粉碎して粒径を約1mmにした。次いで、総固形分濃度が約14重量%の水と粉碎物からなるスラリーを調製し4mの熱栓流反応器内において熱処理した。滞留時間8分に対応する速度で高圧蒸気とともに栓流反応器にポンプ輸送し、φ8.35mmのオリフィスを用いて約210℃に維持した。その後、大気圧下に噴出することによって、反応を急止した。できたスラリーを過して、不溶性固形分から可溶性固形分を含む液を分離した。この可溶性固形分含有液を活性炭、吸着樹脂で脱色し、さらにイオン交換樹脂で脱塩した後、濃縮、乾燥してマンノオリゴ糖を

50

収率 14% を得た。

【0013】

このようにして得られた免疫賦活作用を有する組成物の DP 分布は、例えば DP 1 : 2.4%、DP 2 : 26.6%、DP 3 : 20.2%、DP 4 : 17.8%、DP 5 : 10.9%、DP 6 : 8.9%、DP 7 : 6.0%、DP 8 : 3.6%、DP 9 : 1.9%、DP 10 : 1.7% で、糖鎖中のマンノース残基の含有量は 90% であるが、DP 分布及び糖鎖中のマンノース残基の含有量は加水分解条件により種々の値をとります。オリゴ糖の DP 1 としてはマンノース等、DP 2 としてはマンノビオース等、DP 3 としてはマンノトリオース等、DP 4 としてはマンノテトラオース等、DP 5 としてはマンノペンタオース等、DP 6 としてはマンノヘキサオース等、DP 7 としてはマンノヘptaオース等、DP 8 としてはマンノオクタオース等、DP 9 としてはマンノノナオース等、DP 10 としてはマンノデカオース等で、結合様式は β -1, 4 結合である。このようにして得たマンノオリゴ糖を用いて以下の免疫賦活実験を行った。

試験液の調製

オリゴ糖は 10% FCS を含む RPMI-6410 培地を用いて段階希釈した。すなわち上記マンノオリゴ糖を RPMI-6410 培地 (10% FBS 含む) で 0.5 g/ml 濃度に調製したものを原液として、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 及び 10^{-5} g/ml 溶液を調製した。

マウス脾細胞浮遊液の調製

生後 5 週齢の BALB/c 系雄マウスを 1 週間予備飼育し、その期間中異常の認められなかった動物 2 匹を本試験に用いた。動物は、室温 21 乃至 25℃、湿度 40 乃至 75%、換気回数約 15 回/時、明暗サイクル 12 時間の飼育室内で、TPX 製ケージに 1 乃至 2 匹ずつ収容して固形飼料 (日本クレア (株) 製 CE-2) 及び飲料水として水道水を自由に摂取させて飼育した。

マウス 2 匹を椎脱臼により屠殺して摘出した脾臓を RPMI-1640 培地 (Biowin センセア社製) を 3 ml 入れておいたシャーレに個別に移し、スライドガラスのフロスト部分を用いて細胞を単離した。細胞液をディスポーサブルシリンジに回収し、しばらく放置した後、ステンレスメッシュを通して遠沈管に移し、約 300 × g、4℃ で 5 分間遠心分離を行った。そして上清を除き、沈下にバスツールピペットで RPMI-1640 を 2 ml 加え、十分攪拌した後、再度同条件で遠心分離した。この操作を 2 回繰り返した。最後の遠心分離終了後、上清を廃棄し沈下に RPMI-1640 (10% FBS 含有) を 2 ml 加えて細胞浮遊液とした。血球計測盤を用いて細胞数を計測し、 2×10^6 /ml に濃度を調製した。

リンパ球幼若化

平板 96 穴マイクロタイタープレートに左から 3 列ずつ RPMI-1640、0.5 ml/ml の PHA または LPS、1 ml/ml の PHA または LPS を 10 μ l ずつ加えた。プレートに RPMI-1640 (10% FBS 含有)、左 3 列目から MOS の段階希釈液 (0.5、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 及び 10^{-4} g/ml) を各 10 μ l 添加した。そして左 1 列目を除く全列に細胞浮遊液を 200 μ l ずつ添加し、左 1 列目はブランクとして RPMI-1640 (10% FBS 含有) を 200 μ l 添加した。このプレートを 37℃、5% CO₂ 環境下で培養した。65 時間培養後にプロモデオキシウリジン (BrdU) を添加し、更に 4 時間培養した。そして DNA に取り込まれた BrdU の量を酵素免疫抗体法により定量した。

PHA 及び LPS によるマウスリンパ球の幼若化反応に対する MOS の影響を表に示した。

PHA あるいは LPS を添加しない場合には、MOS を 0.005 ml/ml ~ 2.5 ml/ml 添加したとき、マウスリンパ球の増殖は認められなかった。よって、MOS にはリンパ球を幼若化して分裂を誘起させる作用を有していないことがわかった。

PHA 最終濃度 0.025 ml/ml 及び 0.05 ml/ml の時、2 例中 2 例において MOS 最終濃度 0.005 ml/ml ~ 0.5 ml/ml の範囲でリンパ球分裂増強作用

10

20

30

40

50

が認められた。

LPS 最終濃度 0.025 mg/ml の時、2 例中 1 例において MOS 最終濃度 0.005 mg/ml ~ 0.05 mg/ml の範囲で分裂増強作用が認められた。LPS 最終濃度 0.05 mg/ml の時、2 例中 1 例において MOS 最終濃度 0.005 mg/ml でリンパ球分裂増強作用が認められた。

【0014】

【表 1】

表 マイトジェンによるリンパ球幼若化反応に対する影響

マイトジェン	最終濃度 mg/ml		マンノオリゴ糖 最終濃度(mg/ml)					
			0	0.005	0.05	0.5	5	25
PHA	0.00	exp.1	0.005	0.027	0.008	0.002	-0.054	-0.019
		exp.2	0.040	0.057	0.046	0.053	0.007	0.010
	0.025	exp.1	0.214	0.289	0.257	0.227	0.024	-0.007
		exp.2	0.301	0.411	0.362	0.306	0.051	-0.002
	0.05	exp.1	0.077	0.096	0.095	0.084	0.002	-0.016
		exp.2	0.197	0.236	0.286	0.233	0.054	-0.011
LPS	0.00	exp.1	0.036	0.038	0.031	0.010	-0.026	-0.006
		exp.2	0.024	0.028	0.014	0.005	-0.003	0.021
	0.025	exp.1	0.383	0.466	0.522	0.461	0.073	-0.003
		exp.2	0.401	0.366	0.377	0.380	0.042	-0.004
	0.05	exp.1	0.466	0.465	0.563	0.465	0.050	-0.005
		exp.2	0.458	0.347	0.348	0.308	0.002	-0.008

【0015】

マイトジェン濃度や個体差によって反応性に差が認められたものの、マンノオリゴ糖にリンパ球幼若化反応に対する増強作用が認められた。また、この増強作用は LPS よりも PHA の方が明確に認められた。マンノオリゴ糖は T リンパ球の活性化に強く作用すると考えられた。

実施例 2

コーヒーミックスの製造法

インスタントコーヒー 2.0 g と実施例 1 で調整したマンノオリゴ糖 0.5 g とを混合しコーヒーミックスを調製した。このミックスをお湯 140 ml で溶かし、官能評価した結果、従来のインスタントコーヒーの味を十分維持し、しかも、より濃厚で味わい深いコーヒー飲料であった。日常の食習慣を変えることなく免疫賦活効果を期待できる。

10

20

30

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 2 3 L 2/52
 A 6 1 K 31/7016
 A 6 1 K 31/702
 A 6 1 K 31/736
 A 6 1 K 35/78
 A 6 1 P 37/04
 C 0 8 B 37/00
 // C 0 7 H 3/02
 C 0 7 H 3/04
 C 0 7 H 3/06

A 6 1 K 31/7016
 A 6 1 K 31/702
 A 6 1 K 31/736
 A 6 1 K 35/78
 A 6 1 P 37/04
 C 0 8 B 37/00
 A 2 3 L 2/00
 C 0 7 H 3/02
 C 0 7 H 3/04
 C 0 7 H 3/06

4 C 0 8 8
 4 C 0 9 0

Q
 F

(72)発明者 浅野 一郎

三重県四日市市松本4丁目5番10号

(72)発明者 藤井 繁佳

三重県鈴鹿市三日市3丁目17番28号

Fターム(参考) 2B150 AB10 BC01 BD02 DC15 DD45 DD57

4B017 LC03 LK11

4B018 MD31 MD33 ME14 MF10 MF12

4C057 BB02 BB03 BB04

4C086 AA01 AA02 EA01 EA20 NA14 ZB09

4C088 AB14 AC04 BA12 CA22 MA52 ZB09

4C090 AA04 AA09 BA74 BB02 BB12 BB13 BB14 BC12 CA43 DA22

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application]

This invention relates to the constituent which has an immunostimulatory action which uses as the main ingredients the oligosaccharide which consists of constituent sugar which makes mannose a subject, the ingesta using the constituent, and feed.

[0002]

[Description of the Prior Art]

Immunity is one of the biophylaxis mechanisms for protecting the body from many things, such as a cancer cell made not only in the microorganism which has invaded from the external world, a virus, and a hazardous chemical substance but in the body, and maintaining a healthy state. It is important from a viewpoint of preventive medicine to activate an immune function and to maintain the healthy body. A lifestyle-related disease, cancer, etc. have been a problem especially toward the aging society, and in order to prevent these illnesses beforehand "a meal and health", it has an interest. Therefore, search of an immunity activator and research on the operation mechanism are done out of various foodstuffs. And although various kinds of health supplements are developed and sold, it has not resulted in development of the eating-and-drinking article which can activate immunity easily and economically with everyday eating habits.

[0003]

This invention relates also to effective use of untapped natural resources. As for the coffee extracted residue, the most has been conventionally processed as incineration or industrial waste. Although recent years come and coffee extraction residue has come to be used as compost stock or an activated carbon raw material, it cannot say that they are enough from a viewpoint of the intensive use of untapped natural resources, but it has become an important problem to establish the method of the intensive use of the further coffee extraction residue.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

An object of this invention is to provide the economical and simple ingesta which were moreover excellent in the immunostimulating effect, without being accompanied by developing the constituent which has an immunostimulatory action, and large change of the usual eating-habits custom.

[0005]

[Means for Solving the Problem]

A result of wholeheartedly examination in order that this invention persons may solve these technical problems [like], Mannan to a food material and the Lord who contain mostly from coffee-grounds hydrolyzate. An immunostimulating effect is found out to oligosaccharide in which at least one sort of monosaccharide like MANNO oligosaccharide of the degrees of polymerization 1 thru/or 10 with little content of sugar residue other than mannose residue or mannose, glucose, and galactose carried out 1 thru/or mannose which carried out 10 molecular binding with a subject into a sugar chain, It came to complete this invention. Content of sugar residue other than mannose residue found out that a scope of foodstuffs could be extended by leaps and bounds by obtaining MANNO oligosaccharide of few degrees of polymerization 1 thru/or 10 in color-free and a sugar chain of an anacidity. This invention, Mannose. A monosaccharide made into a subject is related with a constituent which has an immunostimulatory action using as the main ingredients oligosaccharide to which at least one sort of monosaccharide like 1 thru/or oligosaccharide which carried out 10 molecular binding or mannose, glucose, and galactose made a subject 1 thru/or mannose which carried out 10 molecular binding. The constituent concerned means a constituent which uses as the main ingredients two or more sorts of oligosaccharide as which a monosaccharide which made mannose or mannose a subject was chosen 2 thru/or a single compound which carried out 10 molecular binding, or from them.

In a constituent of this invention, it is desirable that it is a constituent which has an immunostimulatory action containing two or more sorts of compounds in which mannose was chosen from 1 thru/or a single compound which carried out 10 molecular binding, or them.

[0006]

The total solid content is received in a constituent of this invention, 60% of the weight or more of a thing has a preferred sum total content ratio of oligosaccharide in which at least one sort of monosaccharide [like 1 thru/or oligosaccharide which carried out 10 molecular binding or mannose, glucose, and galactose] whose monosaccharide which makes mannose a subject is made a subject 1 thru/or mannose which carried out 10 molecular binding, 80% of the weight or more of a thing is still more preferred.

[0007]

In sugar composition of a constituent in this invention, that whose rate of mannose residue is 80 % of the weight or more still more preferably 70% of the weight or more is desirable. Unless it fills a rate of mannose residue to 70%, while an effect cannot expect greatly, a degree of sweetness is also in a tendency for width of increase application to narrow. As constituent sugar, in addition to mannose, although based also on a starting material to hydrolyze,

glucose, galactose, etc. are contained, but it is also removable if needed. About a mannose content of isolation in a constituent, what was stopped to 50% or less is desirable. When it exceeds 50 % of the weight, it is in a tendency to receive restrictions in the range of application for bitter taste of mannose origin. As for oligosaccharide which made mannose a subject, it is preferred that mannose is 2 thru/or the oligosaccharide which carried out 6 molecular binding.

In this invention, a constituent which has an immunostimulatory action which uses as the main ingredients mannose obtained by carrying out hydrolysis treatment of the mannan is preferred. It is preferred that the mannan concerned is what is obtained from coffee beans and/or coffee extraction residue.

In this invention, a constituent which has an immunostimulatory action which uses as the main ingredients mannose obtained by carrying out hydrolysis treatment of the coffee extraction residue is preferred.

This invention relates also to ingesta and feed containing a constituent concerning this invention explained above. A constituent concerning this invention can be used in broad fields, such as ingesta and not only feed but cosmetics, drugs, etc. A constituent of this invention demonstrates an immunostimulating effect, when people take in from a mouth as ingesta.

A copra meal in which a constituent of this invention is obtained, for example from a coconut coconut, The department vegetation HuacraPalm from Fouque and South Africa of a coconut, chinese yam mannan, From yam mannan, acidolysis after extracting mannan, heating-at-high-temperature hydrolysis, It processes by one sort or two sorts or more of methods chosen from enzymatic hydrolysis and microbial fermentation, A sugar mixture and/or a konnyaku potato which were refined by methods, such as activated carbon treatment, adsorption resin processing, ion exchange resin treatment, and ion-exchange membrane processing, Glucomannan, locust bean gum which are contained in a lily, a narcissus, a cluster amaryllis, etc., Galactomannan contained in guar gum etc. Acidolysis, heating-at-high-temperature hydrolysis, It may process by one sort or two sorts or more of methods chosen from enzymatic hydrolysis and microbial fermentation, separation refinement may be carried out by methods, such as activated carbon treatment, adsorption resin processing, ion exchange resin treatment, and ion-exchange membrane processing, and a ratio of mannose may be raised as constituent sugar.

Raw coffee beans or roasted coffee beans Acidolysis, heating-at-high-temperature hydrolysis, It can obtain by processing by one sort or two sorts or more of methods chosen from enzymatic hydrolysis and microbial fermentation, and refining by methods, such as activated carbon treatment, adsorption resin processing, ion exchange resin treatment, and ion-exchange membrane processing.

Coffee extraction residue Or acidolysis, heating-at-high-temperature hydrolysis, enzymatic hydrolysis, It can obtain by refining solution which carried out solubilization treatment by one sort or two sorts or more of methods chosen from microbial fermentation by methods, such as activated carbon treatment, adsorption resin processing, ion exchange resin treatment, and ion-exchange membrane processing.

Generally, if an extractor for commerce extracts roast grinding coffee, galactose which is a side chain of galactomannan contained in roast coffee in that case will solubilize, or arabinogalactan will solubilize by hydrolysis. Therefore, in coffee extraction residue, mannan is abundant, and it is presumed that straight chain structure is moreover taken. On the other hand, although cellulose remains as residue that it is hard to be decomposed, oligosaccharide which makes mannose a subject can be obtained by choosing suitably conditions which hydrolyze mannan specifically without disassembling cellulose.

If extracted in usual fluid coffee or an instant coffee manufacturing process, if coffee extraction residue used in this invention is extraction under application of pressure, and even if it is a thing of what kind of the origin and a process, it can be used under ordinary pressure.

Although a constituent prepared so that acid and/or heat might hydrolyze coffee extraction residue and oligosaccharide might be included in a high grade can also be used for fluid coffee, instant coffee, etc., adding to them as it is, A direction which added what carried out purification treatment, such as decolorization, deodorization, and deoxidation, with activated carbon, ion-exchange resin, a solvent, etc. if needed can provide an original taste of coffee, and richer coffee of a scent.

[0008]

It can also use, after carrying out fractionation to MANNO oligosaccharide which has a specific degree of polymerization with column chromatography etc.

Although a typical method of manufacturing a constituent in which monosaccharide which uses mannose as the main ingredients from coffee extraction residue contains 1 thru/or oligosaccharide which carried out 10 molecular binding is described in this invention below, it is not necessarily limited to the following processes.

As a method of decomposing coffee extraction residue, a method of hydrolyzing according to acid and/or an elevated temperature, a method of decomposing with an enzyme, and a method of decomposing by microbial fermentation are mentioned. It is indicated by JP,61-96947,A, JP,2-200147,A, etc. as a method of hydrolyzing according to acid and/or an elevated temperature. In a reaction vessel for coffee extraction residue which comes out

in a coffee multistage type extraction system for commerce, an acid catalyst can be added, and it can also hydrolyze, and can obtain also by carrying out short time processing and hydrolyzing at an elevated temperature, without adding an acid catalyst. Although it is convenient to use a pipe form plug flow reactor, if it has turned to making a short time react by relatively high temperature, a good result will be obtained no matter what reactor it may use. By making reaction time and reaction temperature adjust, solubilize and hydrolyze, mannan of DP10 thru/or 40 is decomposed into MANNO oligosaccharide of DP1 thru/or 10, it separates from coffee residue after that, and MANNO oligosaccharide is obtained.

A term of "mannan" means a polysaccharide which consists of d-mannose widely. Monosaccharide d-mannose is aldohexose and a configuration of a hydroxyl group combined with carbon which adjoins a carboxyl group in d-glucose is reverse. "Oligosaccharide" means polymer with comparatively few monosaccharides. In particular, in this specification, the number of monosaccharides puts polymer which is ten or less. Although mannose is made into oligosaccharide of DP1 for convenience, if it says strictly, oligosaccharide will put what consists of two or more monosaccharides.

A "degree of polymerization" or "DP" means the number of monosaccharides which constitute oligosaccharide. Therefore, since a degree of polymerization of MANNO oligosaccharide by which mannose is constituted from four monosaccharides, for example is 4, it is indicated to be DP4.

[0009]

"Coffee extraction residue" means what is called coffee grounds after solvents, such as water, extract roast grinding coffee, for example under an ambient condition or a pressurizing condition. What is necessary is to make coffee extraction residue suspended to an aquosity medium for example, and just to make it suspended as a method of decomposing with an enzyme, adding and agitating commercial cellulase, hemicellulase, etc. here. What is necessary is for there to be no problem in particular and just to choose suitably by the optimal action of an enzyme to be used, temperature, conditions, and other factors, if it is quantity, temperature, and conditions of being used for the usual enzyme reaction, as conditions for quantity of an enzyme, temperature made to act, and others.

What is necessary is to carry out inoculation of the microorganism which produces cellulase, hemicellulase, etc. as a method of decomposing by microbial fermentation to coffee extraction residue which made an aquosity medium suspended for example, and just to make it cultivate. What is necessary is just to choose culture conditions suitably by a microorganism which a microorganism to be used produces an enzyme which decomposes

mannan in coffee extraction residue, such as bacteria and basidiomycetes, ****s it, and is used.

[0010]

Reaction mixture containing a constituent in which monosaccharide which makes a subject mannose obtained by an above-mentioned method contains 1 thru/or oligosaccharide which carried out 10 molecular binding refines if needed. As a purification method, decolorization and deodorization are performed with bone charcoal, activated carbon, the carbonic acid **** method, adsorption resin, the magnesia method, a solvent extraction process, etc., and demineralization and deoxidation are performed by ion-exchange resin, an ion-exchange membrane, an electrodialysis, etc. As combination and refining conditions for a purification method, mannose should just choose suitably according to quantity of coloring matter in reaction mixture containing 1 thru/or MANNO oligosaccharide which carried out 10 molecular binding, a salt, acid, etc., and other factors.

[0011]

[Function and Effect(s) of the Invention]

Thus, the constituent in which the monosaccharide which makes a subject the obtained mannose contains 1 thru/or the oligosaccharide which carried out 10 molecular binding ("MANNO oligosaccharide" hereafter) or it is only called "MOS". **** -- although it did not have the operation which carries out blastogenesis of the lymphocyte and induces division, the operation which carries out promotion enhancement of the division of a lymphocyte was accepted.

Since the operation which carries out promotion enhancement of the division which takes place by stimulus of PHA which works to a T lymphocyte was larger than the division which takes place by stimulus of LPS which MOS which is a constituent concerning this invention commits to a B lymphocyte, it can be said that MOS acts to activation of a T lymphocyte strongly.

[0012]

A B lymphocyte divides and specializes by antigen stimulus, serves as an antibody forming cell, and participates in a humoral immunity system. On the other hand, in response to an antigen stimulus, a T lymphocyte turns into a sensitized lymphocyte, serves as a helper cell, it not only participates in a cellular immunity system, but it commits division and differentiation to differentiation growth of a B lymphocyte, and participates also in a humoral immunity system.

When a lymphocyte received an antigen stimulus, since MOS activated the T lymphocyte which has the operation which promotes lymphocyte division and growth and which participates in humoral nature and cellular immunity especially, it found out having an immunostimulatory action.

Next, an example explains this invention concretely.

Example 1

Preparation of MANNO oligosaccharide

In order to make coffee extraction residue easy to send to a reactor, it ground first and particle diameter was about 1 mm. Subsequently, the slurry which consists of water whose total solids concentration is about 14 % of the weight, and a grinding thing was prepared, and it heat-treated in a 4-m heat plug flow reactor. Pumping was carried out to the plug flow reactor with high-pressure steam at speed [/ in holding time 8 minutes], and it maintained at about 210 ** using the 6.35 mmphi orifice. Then, the reaction was sudden-**(ed) by spouting under atmospheric pressure. The made slurry was filtered and the liquid containing soluble solid content was separated from insoluble solid matter. After decolorizing this soluble solid content content liquid with activated carbon and adsorption resin and desalting with ion-exchange resin further, it condensed and dried and MANNO oligosaccharide was obtained with 14% of yield.

[0013]

Thus, DP distribution of the constituent which has the obtained immunostimulatory action, By for example, 1; 2.4% of DP, 2; 26.6% of DP, 3; 20.2% of DP, 4; 17.8% of DP, 5; 10.9% of DP, 6; 8.9% of DP, 7; 6.0% of DP, 8; 3.6% of DP, 9; 1.9% of DP, and 10; 1.7% of DP. Although the content of the mannose residue in a sugar chain is 90%, the content of the mannose residue in DP distribution and a sugar chain can take various values according to a hydrolysis condition. As DP1 of oligosaccharide, as DP2 mannose etc. MANNO biose etc., If MANNO triose etc. are set to DP4 as DP3, MANNOTETORAOSU etc., If are referred to as DP5, and MANNOPENTAOSU etc. are made into MANNO hexa OSU etc. as DP6 and MANNO heptaose etc. are set to DP8 as DP7, as DP9, such as MANNOOKUTAOSU, MANNO nona OSU etc. are MANNO deca OSU etc. as DP10, and a bond form is beta-1 and 4 combination. Thus, the following immunity activation experiments were conducted using the obtained MANNO oligosaccharide.

Preparation of test liquid

Oligosaccharide carried out stage dilution using RPMI-6410 culture medium which contains FCS 10%. Namely, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , and a 10^{-5} g/ml solution were prepared by using as an undiluted solution what prepared the above-mentioned MANNO oligosaccharide to 0.5g [/ml] concentration by RPMI-6410 culture medium (FBS contains 10%).

Preparation of mouse splenic-cells suspension

Preliminary breeding of the BALC/c system male mouse 5-week old [after the birth] was carried out for one week, and two animals the abnormalities in the

period were not accepted to be used for the exam. In the rearing room of room temperature [of 21 thru/or 25 **], 40 thru/or 75% of humidity, about 15 air change rate [/o'clock], and light-and-darkness cycle 12 hours, it accommodated 1 thru/or 2 animals at a time in the cage made from TPX, and as a pellet (CE-2 by CLEA Japan, Inc.), and drinking water, tap water was made to take in freely and they bred it.

The spleen which slaughtered two mice by cervical dislocation and extracted them was individually moved to the petri dish into which 3 ml of RPMI-1640 culture media (made by Biowhittaker) were put, and the cell was isolated using the frothed portion of slide glass. cell sap -- DISUPO -- sable -- after collecting to the syringe and neglecting it for a while, it moved to the centrifugation tube through the stainless mesh, and centrifugal separation was performed for 5 minutes at about 300xg and 4 **. And after adding RPMI-1640 [2-ml] to dregs with Pasteur pipette and agitating enough except for supernatant liquid, it centrifuged on the conditions again. This operation was repeated twice. After the last end of centrifugal separation, supernatant liquid was discarded, RPMI-1640 [2-ml] (10%FBS content) was added to dregs, and it was considered as the suspended cell. The cell number was measured using the corpuscle measurement board, and concentration was prepared to 2×10^6 /ml.

Blastoid transformation

It added RPMI-1640, PHA or LPS 0.5mg [/ml], and three rows of PHAs or LPS of 1mg/ml at a time to the plate 96 hole microtiter plate every [10micro / l] from the left. 10microeach l addition of the stage diluent (0.5 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-4} g/ml) of MOS was left 3 row done [RPMI-1640 (10%FBS content) and] at the left 2 row of the plate. And the suspended cell was added every [200micro / l] in all the [left 1 row] sequences, and 200microl addition of RPMI-1640 (10%FBS content) was left 1 row done as blank. This plate was cultivated under 37 ** and 5%CO₂environment. Bromodeoxyuridine (BrdU) was added after 65-hour culture, and also it cultivated for 4 hours. And it is the bottom in fixed quantity by an enzyme immune antibody method about the quantity of BrdU incorporated into DNA.

The influence of MOS to the blastogenesis of the mouse lymphocyte by PHA and LPS was shown in the table.

When PHA or LPS was not added and 0.005mg/ml - 25mg/ml of MOSs were added, growth of the mouse lymphocyte was not accepted. Therefore, it turned out that it does not have the operation which carries out blastogenesis of the lymphocyte to MOS, and induces division.

In two examples, lymphocyte division potentiation was accepted in the range with an MOS last concentration of 0.005mg/ml - 0.5mg/ml among two examples at the time of the PHA last concentration of 0.025mg/ml, and 0.05mg/ml.

In one example, division potentiation was accepted in the range with an MOS last concentration of 0.005mg/ml - 0.05mg/ml among two examples at the time of the LPS last concentration of 0.025mg/ml. In one example, lymphocyte division potentiation was accepted by the MOS last concentration of 0.005mg/ml among two examples at the time of the LPS last concentration of 0.05mg/ml.

[0014]

[Table 1]

表 マイトジェンによるリンパ球幼若化反応に対する影響

マイトジェン	最終濃度 mg/ml		マンノオリゴ糖 最終濃度(mg/ml)					
			0	0.005	0.05	0.5	5	25
PHA	0.00	exp.1	0.005	0.027	0.008	0.002	-0.054	-0.019
		exp.2	0.040	0.057	0.046	0.053	0.007	0.010
	0.025	exp.1	0.214	0.289	0.257	0.227	0.024	-0.007
		exp.2	0.301	0.411	0.362	0.306	0.051	-0.002
	0.05	exp.1	0.077	0.096	0.095	0.084	0.002	-0.016
		exp.2	0.197	0.236	0.286	0.233	0.054	-0.011
LPS	0.00	exp.1	0.036	0.038	0.031	0.010	-0.026	-0.006
		exp.2	0.024	0.028	0.014	0.005	-0.003	0.021
	0.025	exp.1	0.383	0.466	0.522	0.461	0.073	-0.003
		exp.2	0.401	0.366	0.377	0.380	0.042	-0.004
	0.05	exp.1	0.466	0.465	0.563	0.465	0.060	-0.005
		exp.2	0.458	0.347	0.348	0.308	0.002	-0.008

[0015]

Although the difference was observed in reactivity by mitogen concentration or individual difference, the potentiation to lymphocyte transformation was observed in MANNO oligosaccharide. As for this potentiation, the PHA was clearly accepted rather than LPS. It was thought that MANNO oligosaccharide acted to activation of a T lymphocyte strongly.

Example 2

A manufacturing method of a coffee mix

0.5 g of MANNO oligosaccharide adjusted in Example 1 was mixed with the instant coffee 2.0g, and the coffee mix was prepared. This mix was melted with 140 ml of hot water, as a result of carrying out organic-functions evaluation, moreover, the taste of conventional instant coffee was maintained enough, and it was thicker, and tasted, and it was a deep coffee drink. An immunostimulating effect can be expected without changing everyday eating habits.

[Claim(s)]

[Claim 1]

A constituent which has an immunostimulatory action, wherein a monosaccharide which made mannose a subject uses as the main ingredients oligosaccharide to which at least one sort of monosaccharide like 1 thru/or oligosaccharide which carried out 10 molecular binding or mannose, glucose,

and galactose made a subject 1 thru/or mannose which carried out 10 molecular binding.

[Claim 2]

As opposed to the total solid content, The constituent according to claim 1 whose content ratio of oligosaccharide in which at least one sort of monosaccharide [like 1 thru/or oligosaccharide which carried out 10 molecular binding or mannose, glucose, and galactose] whose monosaccharide which makes mannose a subject is made a subject 1 thru/or mannose which carried out 10 molecular binding is 60 % of the weight or more.

[Claim 3]

The constituent according to any one of claims 1 to 2 whose rate of mannose residue is 70 % of the weight or more in sugar composition.

[Claim 4]

The constituent according to any one of claims 1 to 2, wherein oligosaccharide which made mannose a subject is one or more sorts as which mannose was chosen from 2 thru/or oligosaccharide which carried out 6 molecular binding.

[Claim 5]

A constituent obtained when the constituent according to any one of claims 1 to 4 carries out hydrolysis treatment of the mannan.

[Claim 6]

The constituent according to any one of claims 1 to 5 which is that by which mannan of the preceding clause is obtained from coffee beans and/or coffee extraction residue.

[Claim 7]

Ingesta or feed containing the constituent according to any one of claims 1 to 6.